



(19) **SU** <sup>(11)</sup> **1 526 223** <sup>(13)</sup> **A1**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup> **C 12 N 1/26//C 12 N 1/26, C**  
**12 R 1:72**

STATE COMMITTEE  
FOR INVENTIONS AND DISCOVERIES

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 4328452/13, 16.11.1987

(46) Date of publication: 30.04.1995

(71) Applicant:

Vsesojuznyj nauchno-issledovatel'skij  
institut biosinteza belkovykh veshchestv

(72) Inventor:

Maksimova G.N.,  
Nikolin S.I., Vinarov A.Ju., Konobrij  
V.N., Volovnenko A.F., Platonov Ju.V., Burevich  
Z.V., Morozova G.R.

(54) **METHOD OF PREPARING OF YEAST BIOMASS**

(57) Abstract:

FIELD: microbiological industry.  
SUBSTANCE: yeast is grown under aeration conditions on the aqueous nutrient medium containing purified liquid paraffins as a carbon source and mineral sources of nitrogen, phosphorus, potassium, magnesium, trace elements. Sodium sulfite (0.0005-0.001%) and suspension of higher fungi mycelium Polyporus coprinus and others

obtained by submerged cultivation were used as stimulating agents for yeast growth. These components were mixed under aeration conditions with trace elements solution (iron, zinc, manganese sulfates) at pH 2-4 and fed for yeast fermentation at concentration 0.005-0.000005% to flow. EFFECT: increased biomass yield, improved quality of product, decreased cost. 3 tbl

S U 1 5 2 6 2 2 3 A 1

S U 1 5 2 6 2 2 3 A 1



(19) **SU**<sup>(11)</sup> **1 526 223**<sup>(13)</sup> **A1**

(51) МПК<sup>6</sup> **С 12 N 1/26//С 12 N 1/26, С 12**

**R 1:72**

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО  
ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ  
СССР**

(21), (22) Заявка: 4328452/13, 16.11.1987

(46) Дата публикации: 30.04.1995

(56) Ссылки: Авторское свидетельство СССР N 119410, кл. С 12N 1/16, 1965. Авторское свидетельство СССР N 1044033, кл. С 12N 1/16, 1983.

(71) Заявитель:

Всесоюзный научно-исследовательский  
институт биосинтеза белковых веществ

(72) Изобретатель: Максимова Г.Н.,  
Николин С.И., Винаров А.Ю., Конобрий  
В.Н., Воловненко А.Ф., Платонов  
Ю.В., Буревич З.В., Морозова Г.Р.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ ДРОЖЖЕЙ

(57)

Изобретение относится к микробиологической промышленности и может быть использовано для получения кормовой биомассы, а также в медицинской, пищевой и других отраслях промышленности. Целью изобретения является повышение выхода биомассы, улучшение качества готового продукта, а также удешевление процесса. Способ заключается в том, что дрожжи выращивают в условиях аэрации на водной питательной среде, содержащей в качестве источника углерода очищенные

жидкие парафины и минеральные источники азота, фосфора, калия, магния, микроэлементов, а в качестве стимуляторов роста дрожжей на стадии выращивания сернистоокислый натрий (0,0005 - 0,001%) и полученную при глубинном культивировании суспензию мицелия высших грибов *Polyporus*, *Coprinus* и др., которую в условиях аэрации смешивают с раствором микроэлементов (сернистые соли железа, цинка, марганца) при pH 2,0 - 4,0 и подают на ферментацию дрожжей в количестве 0,005 - 0,000005% к потоку. 3 табл.

S U 1 5 2 6 2 2 3 A 1

S U 1 5 2 6 2 2 3 A 1

Изобретение относится к микробиологическому синтезу белка и может быть использовано для получения биомассы микроорганизмов, в частности дрожжей, например, на очищенных жидких парафинах.

Целью изобретения является повышение выхода биомассы, улучшение качества готового продукта, а также удешевление процесса.

Способ заключается в том, что дрожжи выращивают в условиях аэрации периодическим, приточно-отъемным или непрерывным способом на жидких питательных средах, содержащих источники углерода, например очищенные жидкие парафины, и минеральные источники азота, фосфора, калия, магния, микроэлементов.

При этом в качестве стимуляторов роста дрожжей на стадии выращивания используют сернистокислый натрий (0,0005-0,0020%) и полученную при глубинном культивировании суспензию мицелия высших грибов родов *Polyporus*, *Coprinus* и других, которую подкисляют, смешивая с раствором микроэлементов (сернистые соли железа, цинка, марганца) при pH 2,0-4,0, и подают на ферментацию дрожжей в количестве 0,05-0,000005% к протону.

Выращивание дрожжей проводят как в условиях периодического, так и непрерывного культивирования при pH 3,8-5,5, t 32-40 °C и скорости потока 0,1-0,35 ч<sup>-1</sup>.

При этом было установлено, что биологическая активность грибного мицелия, выдержанного смешиванием с раствором микроэлементов при определенных условиях (pH 2,0-4,0), т.е. его стимулирующее действие на рост дрожжей значительно увеличивается, что проявляется прежде всего в резком сокращении количества подаваемого на ферментацию стимулятора (в 1500-50000 раз), причем одновременное использование стимуляторов дает результат, не равный сумме результатов, получаемых от применения каждого стимулятора в отдельности, что наглядно видно из приведенных в табл. 1-3, а также в примерах данных.

В табл.1 приведены результаты по изучению влияния различных значений pH выдерживания грибного мицелия *Polyporus squamosus* ВСБ-917 (ЦМП-П-169) на его стимулирующее действие. Биологическую активность, т.е. стимулирующее действие грибного мицелия на рост парафинокисляющих дрожжей *Candida maltosa* ВСБ-899 (ЦМП-П-7262) определяли выращиванием биомассы в колбах на качалке в течение 24 ч при t 32-34 °C и установлением ее относительного прироста.

Как видно из табл. 1, при выдерживании грибного мицелия с раствором микроэлементов максимальная биологическая активность, т.е. стимулирующее действие грибного мицелия *Polyporus squamosus* на рост парафинокисляющих дрожжей имеет место при pH 3,0-3,5, при этом активация стимулятора отмечается в интервале pH 2,0-4,0.

При выдерживании суспензии грибного мицелия при более высоких значениях pH среды (pH 5,0 и pH 5,5) активация стимулятора не наблюдается, а выдерживание суспензии грибного мицелия

при значениях pH среды, меньших pH 2, нецелесообразно, так как активация стимулятора незначительная, а технически выполнение процесса затрудняется, так как требует наличия кислотоупорного оборудования и трубопроводов.

Как видно из табл. 2, после выдерживания суспензии грибного мицелия ЦМП-П-169 в растворе солей при pH 3,1 его биологическая активность существенно увеличивается, т.е. стимулирующее действие на рост парафинокисляющих дрожжей проявляется при концентрации стимулятора в  $10^{-3}$ - $10^{-6}$  меньшей, чем при подаче его непосредственно после выращивания грибного мицелия при pH 5,5-6,5. Дрожжи *Candida maltosa* ВСБ-899 (ЦМП-П-У262) выращивали периодически в колбах на качалке на минеральной среде, содержащей в качестве источника углерода 1,0 об. очищенных жидких парафинов фракции C<sub>10</sub>-C<sub>19</sub>. Выращивание дрожжей проводили в течение 24 ч.

Как видно из табл.3 биологическая активность грибного мицелия после обработки в соответствии с примечанием существенно увеличилась, а именно стимулирующее действие его проявляется при концентрации в 5000 раз меньшей, чем в контроле по прототипу (гриб без обработки), при этом выход биомассы выше, чем в контроле (без добавок гриба), на 10,5% и на 9,1% больше, чем по прототипу. Относительный прирост продуктивности на 13,5% выше, чем в контрольном варианте, и на 12,08% выше, чем по прототипу.

Пример 1. Дрожжи *Candida maltosa* (ЦМП-П-У262) выращивали периодически в колбах на качалке с объемом питательной среды 100 мл, которая включала в себя 10,0 г/л NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7,0 г/л K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, а также микроэлементы, раствор которых предварительно смешивали при аэрации при pH 3,1 с суспензией грибного мицелия с тем, чтобы концентрация этих компонентов в растворе питательной среды составляла, г/л: MgSO<sub>4</sub> · xH<sub>2</sub>O 0,58; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,116; FeSO<sub>4</sub> · xH<sub>2</sub>O 0,052; MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0,0131, а суспензии грибного мицелия *Polyporus squamosus* 0,01 об.

В колбу добавляли также 1 об. очищенных жидких парафинов фракции C<sub>10</sub>-C<sub>19</sub> и производили выращивание дрожжей при t 32-34 °C, pH 5,5. Концентрация биомассы составила 4,61 г/л, выход биомассы составил 59,87% В контрольном опыте, т.е. без добавок грибного мицелия концентрация биомассы 4,96 г/л, т.е. выход биомассы составил 64,42% В контроле по прототипу, т.е. при добавлении 0,02% суспензии необработанного грибного мицелия, взятого непосредственно после ферментации, т.е. при pH 6,0 концентрация биомассы составила 5,28 г/л, т.е. выход биомассы составил 65,97%

Пример 2. Дрожжи *Candida maltosa* (ЦМП-П-У262) выращивали на среде и в условиях по примеру 1. При этом концентрация суспензии грибного мицелия *Polyporus squamosus* составила 0,005 об.

Концентрация биомассы в колбе составила 5,14 г/л, выход биомассы составил 67,75% В контрольном опыте, т.е. без добавок грибного мицелия концентрация биомассы составила 4,97 г/л, т.е. выход биомассы

составил 64,42%

По прототипу, т.е. при добавлении 0,02% суспензии необработанного мицелия, взятой непосредственно после ферментации, т.е. при pH 6,0 концентрация биомассы составила 5,08 г/л, т.е. выход биомассы составил 65,97%

Пример 3. Дрожжи *Candida maltosa* ВСБ-899 (ЦМГМ-У262) выращивали на среде и в условиях по примеру 1. В качестве биостимулятора в колбы вносили 0,0005 об. суспензии грибного мицелия *Polyporus squamosus*, предварительно выдержанной при аэрации и перемешивании в течение 20 ч при pH 3,1. Концентрация биомассы составила 5,51 г/л, выход биомассы составил 71,56% В контрольном опыте, т.е. без добавок грибного мицелия концентрация биомассы составила 4,96 г/л, т.е. выход биомассы составил 64,4%

По прототипу, т.е. при добавлении 0,02% суспензии необработанного грибного мицелия, взятой непосредственно после ферментации, т.е. при pH 6 концентрация биомассы составила 5,08 г/л, т.е. выход биомассы составил 65,97%

Пример 5. Дрожжи *Candida maltosa* (ЦМГМ-У262) выращивали на среде и в условиях по примеру 1. В качестве биостимулятора в колбы вносили 0,000005 об. суспензии грибного мицелия, предварительно выдержанной при аэрации и перемешивании в течение 20 ч при pH 3,1. Концентрация биомассы составила 5,02 г/л, выход биомассы составил 65,19% В контрольном опыте, т.е. без добавок грибного мицелия концентрация биомассы составила 4,96 г/л, т.е. выход биомассы составил 64,42%

По прототипу, т.е. при добавлении 0,02% суспензии необработанного мицелия, взятой непосредственно после ферментации, т.е. при pH 6,0 концентрация биомассы составила 5,08 г/л, т.е. выход биомассы составил 65,97%

Пример 5. Дрожжи *Candida maltosa* (ЦМГМ-У262) выращивали на среде и в условиях по примеру 1. В качестве биостимулятора в колбы вносили 0,000001 об. суспензии грибного мицелия, предварительно смешанной при аэрации и перемешивании с раствором микроэлементов при pH 3,1. Концентрация биомассы составила 4,98 г/л, выход биомассы составил 64,68% В контрольном опыте, т.е. без добавок грибного мицелия концентрация биомассы составила 4,96 г/л, т.е. выход биомассы составил 64,42%

По прототипу, т.е. при добавлении 0,02% суспензии необработанного мицелия, взятой непосредственно после ферментации, т.е. при pH 6,0 концентрация биомассы составила 5,08 г/л, т.е. выход биомассы составил 65,97%

Пример 6. Дрожжи *Candida maltosa* (ЦМГМ-У262) выращивали непрерывно в десятилитровом аппарате с рабочим объемом 5 л на минеральной среде, содержащей следующие соли, г/л:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,10;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (70%-ной) 2,14;  $\text{KCl}$  1,34;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,81;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,162;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,072;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,018.

При этом при приготовлении рабочего раствора солей раствор макро- и микроэлементов смешивали отдельно. В раствор микроэлементов ( $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ) при pH 2,9 добавляли суспензию грибного мицелия *Fusarium culmorum* так, чтобы его концентрация в

аппарате составляла 0,00005 об. В аппарат также добавляли 375 мл/ч отработанной культуральной жидкости (ОЮЖ), т.е. 30% от общего протока в ферментере.

В ОЮЖ предварительно растворяли натрий сернистокислый в количестве 10 мл, что составило 0,0008% от общего протока в аппарате или 0,0026% от объема рециркулируемой культуральной жидкости.

В качестве источника углерода в аппарат добавляли 30 мл/ч очищенных парафинов.

Дрожжи выращивали непрерывно при скорости разбавления среды 0,25 ч<sup>-1</sup>, при температуре 32-34°C, аэрации воздухом 1,8 л/л/ч, числе оборотов мешалки 1200 об/мин. При этом концентрация биомассы составила 20,77 г/л (асд), выход биомассы составил 115,71% продуктивность 5,19 г/л/ч. Расходный коэффициент составил 0,86 т/т готового продукта.

В контрольном опыте, т.е. без добавок стимуляторов при тех же условиях выращивания концентрация биомассы составила 16,56 г/л, т.е. выход биомассы составил 94,3% Расходный коэффициент составил 1,06 т/т готового продукта.

Содержание сырого протеина в опыте составило 62% содержание остаточных углеводов составило 1,8% в контрольном опыте содержание остаточных углеводов составило 2,9% сырого протеина 59,7%

Удельный расход суспензии грибного мицелия составил 0,024 г/кг (0,024 кг/т готового продукта), в то время как контроль по прототипу 30 кг/т готового продукта.

Пример 7. Дрожжи *Candida maltosa* ВСБ-899 (ЦМГМ-У262) выращивали по примеру 6.

В аппарат добавляли 0,00001 об. суспензии грибного мицелия *Fusarium culmorum*. В аппарат добавляли также 25 мл/ч отработанной культуральной жидкости (ОЮЖ), т.е. 50% от общего протока в ферментере. В ОЮЖ предварительно растворяли натрий сернистокислый в количестве 25 мг, что составляло 0,002% от общего протока в аппарате или 0,004% от объема рециркулируемой культуральной жидкости.

В качестве источника углерода в аппарат добавляли 30 мл/ч очищенных парафинов.

При этом концентрация биомассы составила 20,38 г/л (асд), выход биомассы составил 113,56% продуктивность процесса 5,09 г/л/ч, расходный коэффициент по парафину 0,88 т/т готового продукта.

Пример 8. Дрожжи *Candida maltosa* ВСБ-778 выращивали непрерывно в десятилитровом аппарате с рабочим объемом среды 5 л на минеральной среде, содержащей, г/л:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (70%-ной) 1,53;  $\text{KCl}$  0,96;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,58;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,0116;  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,062;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,0131.

В питательную среду добавляли 2,5 об. к потоку парафина, а также сульфит натрия и суспензию мицелия гриба *Polyporus squamosus* ВСБ-917 в следующем порядке: сначала в течение 8 ч подавали одновременно 0,0008% к потоку сульфит натрия и 0,00001 об. суспензии грибного мицелия, выдержанного в растворе солей микроорганизмов (цинка, железа, марганца и магния) при pH 3,1; затем в течение 8 ч подавали 0,0008% к потоку сульфит натрия,

S U 1 5 2 6 2 2 3 A 1

а в следующие 8 ч подавали лишь грибной биостимулятор, после чего повторяли тот же порядок подачи стимуляторов. Выращивание дрожжей вели при  $d \ 0,25 \ ч^{-1}$ .

При этом концентрация биомассы составляла 20,9 г/л, т.е. выход биомассы от заданного парафина равнялся 107,1% продуктивность процесса  $5,22 \ кг/м^3/ч$ . В контрольном варианте, который проводили в тех же условиях, но без указанной подачи стимуляторов, концентрация биомассы составила 17,5 г/л, т.е. выход биомассы составил 89,6% продуктивность процесса составила  $4,37 \ кг/м^3/ч$ .

Таким образом, предлагаемый способ по сравнению с известным позволяет повысить выход биомассы, улучшить качество целевого продукта за счет снижения содержания остаточных углеводов и повышения содержания сырого протеина, а также добиться удешевления процесса за счет снижения концентрационного порога стимулятора, снижения расходного

коэффициента (данные приведены в таблицах и примерах).

**Формула изобретения:**

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ ДРОЖЖЕЙ, предусматривающий выращивание их в условиях аэрации на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода n-парафины, источники азота, фосфора, раствор микроэлементов, содержащий сернокислые соли железа, цинка, марганца, сульфит натрия и суспензию мицелия высших грибов в качестве стимуляторов роста, с последующим выделением целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода биомассы, улучшения качества готового продукта, а также удешевления процесса, суспензию мицелия высших грибов предварительно подкисляют путем смешивания с раствором микроэлементов и подают в процесс выращивания в количестве 0,005 0,000005 об. к протоку совместно или поочередно с сульфитом натрия.

25

30

35

40

45

50

55

60

S U 1 5 2 6 2 2 3 A 1

Таблица 1

Влияние различных значений pH выдерживания грибного мицелия ЦММП-F169 на его стимулирующее действие (концентрация суспензии грибного мицелия 0,0001%)

рН выдерживания грибного мицелия	Концентрация биомассы, г/л	Относительный прирост биомассы, %	Выход биомассы от сырья, %	Увеличение хода биомассы, %
Контроль грибного мицелия без изменения, рН.				
5,5	0,371	-	48,18	-
2,0	0,379	2,16	49,22	1,04
2,5	0,391	3,23	50,78	2,60
3,0	0,409	10,24	53,12	4,94
3,5	0,405	9,16	52,60	4,42
4,0	0,392	5,66	50,91	2,13
5,0	0,375	1,07	48,18	-

Таблица 2

Влияние концентрации суспензии грибного мицелия *Polyporus squamosus* ВСБ-917 (ЦММП-F169) на его биологическую активность после выдерживания его в растворе солей при pH 3,1 в процессе выращивания дрожжей *Candida maltosa* ВСБ-899 (ЦММП-У262)

Концентрация стимуляторов, %	Прирост биомассы, г/л	Прирост биомассы, отн. %	Выход биомассы, %	Увеличение выхода биомассы, %
Контроль ( без добавок )	4,96	-	64,42	-
0,01	4,61	-7,05	59,87	-4,55
0,005	5,14	3,62	66,75	2,33
0,001	5,35	7,87	69,48	5,06
0,0005	5,51	11,09	71,56	7,14
0,0001	5,41	9,07	70,25	5,83
0,00005	5,33	8,67	69,22	4,80
0,00001	5,09	2,62	66,10	1,68
0,000005	5,02	1,21	65,19	0,77
0,000001	4,98	0,41	64,68	0,26
Контроль по прототипу ( 0,05% грибного мицелия при pH 6,00)	5,08	2,41	65,97	1,55

Таблица 3

Результаты совместного действия сернистокислого натрия и суспензии грибного мицелия *Fusarium culmorum* ВСБ-927 (ЦМПП-F258) после его выдерживания с раствором микроэлементов при pH 3,1 на рост парафинокисляющих дрожжей *Candida maltosa* ВСБ-899 (ЦМПП-У261) в условиях непрерывного культивирования

Параметры способа	Контроль	Контроль по прототипу (гриб без обработки) 0,05% к потоку или 30 г/кг	Сульфит натрия 0,001%	Грибной мицелий после обработки 0,00005% к потоку или 0,03 г/кг*	Сульфит натрия 0,0001% и грибной мицелий после обработки 0,00005%
Объем аппарата, л	5	5	5	5	5
Отбор л/ч	1,27	1,27	1,27	1,27	1,27
Подача парафина, мл/ч	30	30	30	30	30
г/л	17,95	17,95	17,95	17,95	17,95
Время выращивания, ч	3,93	3,93	3,93	3,93	3,93
Скорость разбавления, ч <sup>-1</sup>	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Концентрация биомассы, г/л	16,56	16,81	18,10	18,82	20,77
Продуктивность процесса (удельная) г/л	4,14	4,20	4,52	4,70	5,19
Выход биомассы, %	94,30	95,72	100,82	104,84	115,71
Раствор рО <sub>2</sub> , %	1,9	-	2,24	1,23	1,47
Расходный коэффициент	1,06	1,04	0,99	0,95	0,85
Увеличение продуктивности процесса, отн. %	-	1,44	9,17	13,52	25,36

П р и м е ч а н и е. Условия обработки грибного мицелия *Fusarium culmorum* ВСБ-927 (ЦМПП-F258): выращивание грибного мицелия при  $t^{\circ} = 26^{\circ}\text{C}$ , конечный pH после выращивания pH 5,6; по окончании процесса выращивания довели pH до 3,1, смешали с раствором микроэлементов, при аэрации воздухом выдерживали в течение 2 ч и затем направили на ферментацию в количестве 0,00005%.